

## 干玉米纤维饲料与羊草组合替代苜蓿干草对体外瘤胃发酵的影响

郝小燕<sup>1,2</sup> 张广宁<sup>1</sup> 么恩悦<sup>1</sup> 刘 岩<sup>1</sup> 孙凯晶<sup>1</sup> 张永根<sup>1\*</sup>

(1.东北农业大学动物科学技术学院, 哈尔滨 150030; 2.山西农业大学动物科技学院, 太谷 030801)

**摘 要:** 本试验旨在研究干玉米纤维饲料 (DCGF) 与羊草组合替代饲料中的部分苜蓿干草对奶牛体外瘤胃发酵的影响。以奶牛饲料为发酵底物, 采用 DCGF 与羊草组合后分别等比替代底物中 0、5.00%、10.50%、17.50%、22.90% 的苜蓿干草, 其中 DCGF 在底物中比例分别为 0、3.00%、7.00%、11.00% 和 15.00%, 分别命名为 0DCGF、3DCGF、7DCGF、11DCGF、15DCGF 组。测定体外发酵 24 h 的发酵参数、微生物区系及 48 h 的产气参数。结果表明: 1) DCGF 与羊草组合替代苜蓿干草对体外发酵产气量、潜在产气量和产气速率影响显著 ( $P<0.05$ ), 均随着替代比例的增加而先升高后下降, 其中 11DCGF 组最高; DCGF 与羊草组合替代苜蓿干草对体外发酵干物质消失率的影响显著 ( $P<0.05$ ), 11DCGF 和 15DCGF 组显著高于其他各组 ( $P<0.05$ )。2) DCGF 与羊草组合替代苜蓿干草对发酵液微生物蛋白、氨态氮、乙酸、丙酸、丁酸和总挥发性脂肪酸浓度影响显著 ( $P<0.05$ ), 均随着替代比例的增加而呈先升高后平缓的趋势; DCGF 与羊草组合替代苜蓿干草对发酵液 pH 影响显著 ( $P<0.05$ ), 随着替代比例的增加而呈先下降后平缓的趋势。3) DCGF 与羊草组合替代苜蓿干草对发酵液黄色瘤胃球菌、产琥珀酸丝状杆菌、溶纤维丁酸弧菌的相对数量影响显著 ( $P<0.05$ ), 均随着替代比例的增加呈先升高后平缓的趋势; 发酵液牛链球菌、溶淀粉琥珀酸单胞菌、嗜淀粉瘤胃杆菌、白色瘤胃球菌的相对数量各组间无显著差异 ( $P>0.05$ )。综上所述, 利用 DCGF 与羊草组合替代奶牛饲料中部分苜蓿干草有利于体外瘤胃发酵, 其中替代 17.50% 和 22.90% 苜蓿干草的体外发酵效果较好, 此时饲料中 DCGF 的比例分别为 11.00% 和 15.00%。

**关键词:** 干玉米纤维饲料; 苜蓿干草; 产气量; 瘤胃发酵; 微生物区系

**中图分类号:** S816

我国畜牧业持续快速发展的同时, 饲草用量也在大幅度上升, 饲料和优质饲草短缺的问

收稿日期: 2017-08-29

基金项目: 国家奶牛产业技术体系项目 (CARS-37)

作者简介: 郝小燕 (1990-), 女, 内蒙古乌兰察布人, 讲师, 博士, 研究方向为反刍动物营养。E-mail: haoxiaoyan1990@sina.com

\*通信作者: 张永根, 教授, 博士生导师, E-mail: zhangyonggen@sina.com

题正日益突出,而我国奶牛养殖业的发展也受到国内优质粗饲料资源短缺的限制。随着畜牧业的不断发展,奶牛存栏量进一步增加,优质牧草的供需缺口仍将以每年 10%左右的速度递增。据统计,2015 年我国苜蓿的进口总量突破 120 万 t,同比增长 37.2%,成为苜蓿进口第一大国<sup>[1]</sup>。

近年来我国玉米淀粉加工业迅速发展,每年大量的玉米用于加工玉米淀粉。生产玉米淀粉的过程伴随有数量庞大的副产物产生,包括玉米纤维、玉米浆、玉米蛋白质饲料、玉米胚芽粕等。玉米纤维饲料(corn gluten feed,CGF)就是湿法生产玉米淀粉的副产物之一,由玉米浆和玉米纤维组成,具有粗蛋白质含量高、纤维含量高、溶解率高、容积密度大等特点,且其奶牛产奶净能达到 7.99 MJ/kg<sup>[2]</sup>。CGF 价格低廉,在畜禽饲料中合理利用对降低畜禽养殖成本、提高经济效益有重要意义。

已有大量的研究证明,CGF 可以作为一种价格低廉的饲料原料用于反刍动物生产,且合理比例内利用对奶牛生产性能和机体健康没有不良影响<sup>[3-4]</sup>。在国外,CGF 更多是以湿玉米纤维饲料(wet corn gluten feed,WCGF)被利用,少数研究中利用干玉米纤维饲料(dry corn gluten feed,DCGF)作为奶牛饲料。Macleod<sup>[5]</sup>利用 WCGF 替代奶牛饲料中 40%豆粕或 50%玉米后,对奶牛干物质采食量没有显著影响,并且改善了乳品质,提高了乳脂率。Montgomery 等<sup>[6]</sup>报道富含快速发酵碳水化合物的饲料在瘤胃中快速发酵可能导致瘤胃微生物代谢紊乱,引起亚急性瘤胃酸中毒。但饲喂 WCGF 可以有效避免这种代谢性紊乱,因为 WCGF 的主要供能物质为可发酵纤维,而不是淀粉。DCGF 在营养方面保留了 WCGF 绝大部分营养特点,且在贮存和运输方面较 WCGF 更方便。Firkins 等<sup>[7]</sup>研究表明,20%的 DCGF 和 1%碳酸氢钠组合可以替代奶牛饲料中相同比例的玉米青贮,并取得良好的饲养效果。目前,关于 DCGF 作为奶牛饲料的纤维来源替代苜蓿干草的研究很少,相关数据非常有限。由于 DCGF 纤维长度较小,不能有效地刺激反刍,DCGF 在奶牛饲料中的应用要与长纤维饲料(例如羊草)合理搭配,以确保瘤胃发酵功能正常。本试验采用体外产气法研究 DCGF 与羊草组合替代饲料中的部分苜蓿干草对奶牛体外瘤胃发酵的影响,为 DCGF 替代苜蓿干草在奶牛生产中的应用提供数据和理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 发酵底物制备及成分分析

59 表 1 发酵底物组成及营养水平 (干物质基础)

项目	组别 Groups				
Items	0DCGF	3DCGF	7DCGF	11DCGF	15DCGF
原料 Ingredients					
苜蓿干草 Alfalfa hay	23.40	18.00	13.00	5.90	
羊草 <i>Chinese leymus</i>		2.00	3.50	6.50	7.90
干玉米纤维饲料 DCGF		3.00	7.00	11.00	15.00
玉米青贮 Corn silage	23.50	23.90	23.40	23.50	24.00
玉米 Corn	22.30	22.30	22.30	22.30	22.30
豆粕 Soybean meal	11.50	11.50	11.50	11.50	11.50
棉籽粕 Cottonseed meal	7.70	7.70	7.70	7.70	7.70
干酒糟及其可溶物 DDGS	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50
甜菜粕 Beet pulp	4.20	4.20	4.20	4.20	4.20
小苏打 NaHCO <sub>3</sub>	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
脂肪粉 Fat powder <sup>1)</sup>	1.40	1.40	1.40	1.40	1.40
石粉 Limestone	0.38	0.38	0.38	0.38	0.38
食盐 NaCl	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12
预混料 Premix <sup>2)</sup>	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
合计 Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
营养水平 Nutrient levels <sup>3)</sup>					
粗蛋白质 CP	18.0	17.8	17.8	17.7	17.6
中性洗涤纤维 NDF	32.5	32.9	33.7	34.4	35.0
酸性洗涤纤维 ADF	20.3	20.0	19.3	18.5	18.1
非纤维性碳水化合物 NFC	36.5	36.7	37.1	35.3	34.8
淀粉 Starch	21.2	21.2	21.4	21.5	21.4
产奶净能 NE <sub>L</sub> /(MJ/kg)	7.02	7.02	7.11	7.02	6.98

62           <sup>2)</sup>每千克预混料含有 One kg of premix contained the following:Ca 142.7 g, P 54.2 g, Mg 49.6 g, K 0.5 g,  
63   Na 106.7 g,Co 11 mg,Cu 577 mg, Fe 4 858 mg, I 51 mg, Mn 1 806 mg, Se 13 mg, Zn 1 694 mg, VA 115 240  
64   IU, VD 46 100 IU, VE 576 IU。

65 <sup>3)</sup>产奶净能根据《奶牛饲养标准》<sup>[8]</sup>计算得出，其他营养成分均为实测值。NE<sub>L</sub> was calculated based on  
66 *Feeding Standards of Dairy Cow*<sup>[8]</sup>, while the other nutrient levels were measured values.

67 1.2 瘤胃液的采集与处理

68 选用 2 头体况良好、健康且装有永久性瘤胃瘘管的产奶量为 (24.5±0.8) kg 的荷斯坦  
69 奶牛作为瘤胃液的供体动物。散栏饲养，每天于 07:30 和 14:30 饲喂，自由饮水。试验动物  
70 全混合日粮 (TMR) 组成及营养组分见表 2。于晨饲后 3 h 分别从 2 头牛瘤胃瘘管采集瘤胃  
71 液各 1 000 mL，置于 39 °C 预测的保温瓶中并迅速带回实验室。将采集的瘤胃液充分混匀后  
72 经 4 层纱布过滤[同时通入二氧化碳 (CO<sub>2</sub>)]备用，且整个操作过程保证瘤胃液处于 39 °C。

73 表 2 奶牛全混合日粮组成及营养水平 (干物质基础)

74 Table 2 Composition and nutrient levels of the TMR for dairy cows (DM basis) %

原料 Ingredients	含量 Content	营养水平 Nutrient levels	含量 Content
精饲料 Concentrate	25.70	粗蛋白质 CP	17.2
蒸汽压片玉米 Steamed rolled corn	17.61	中性洗涤纤维 NDF	32.9
湿啤酒糟 WDGS	7.45	酸性洗涤纤维 ADF	21.0
全棉籽 Whole cottonseed	7.66	淀粉 Starch	21.2
玉米青贮 Corn silage	32.62	钙 Ca	0.88
进口苜蓿 Imported alfalfa hay	5.25	磷 P	0.37
木薯根 Tapioca root	3.71	产奶净能 NE <sub>L</sub> /(MJ/kg)	7.15
合计 Total	100.00		

75 精饲料配方由美国蓝德雷公司提供，产品由科菲特公司代加工。The formulation provided by Land  
76 O'Lakes Co. in America, and produced by Cofeed Co.

77 1.3 体外发酵

78 体外发酵装置由德国 Endress+Hauser 公司生产的产气全自动记录装置 (Cerabar T  
79 PMP131,Memograph M RSG40) 和奥特奇公司提供软件系统组成。在配制好的缓冲液中通入  
80 饱和的 CO<sub>2</sub>，直到缓冲液变成无色透明的液体。缓冲液预热至 39 °C，与新鲜瘤胃液以 2:1  
81 (V/V) 的比例混合，保持混合发酵液为漩涡混匀状态，温度为 39 °C，并持续通入 CO<sub>2</sub>。  
82 称取 0.5 g 样品到已知重量 (105 °C 烘干 2 h 后称量) 的 F75 滤袋中并封口。样品放入对应  
83 编号的发酵瓶中，通入 CO<sub>2</sub>，拧紧瓶盖，将所有发酵瓶与气压记录系统链接，连续 10~12 h  
84 记录气压变化，检查发酵瓶的气密性。经检验气密性良好的发酵瓶中用抽滤泵泵入混合发酵  
85 液 100 mL，每个样品设计 6 个重复，并设计 3 个空白用于数据矫正。样品分别连续发酵 24  
86 和 48 h，实时监控发酵瓶连续 48 h 的产气量并自动记录。

#### 1.4 样品采集和处理

体外发酵 24 h 后每组分别取出 3 个发酵瓶,取发酵液 5 mL 到离心管中并于-80 ℃保存,用于微生物总 DNA 的提取。取出滤袋在自来水下冲洗直到水无色无味,冲洗干净的滤袋在 105 ℃条件下烘干 4 h 至恒重,计算样品的干物质消失率(dry matter disappearance rate,DMD)。另采集 50 mL 发酵液分装于离心管中,测定 pH,然后 3 500 r/min 离心 15 min,用于测定挥发性脂肪酸(VFA)、氨态氮(NH<sub>3</sub>-N)和微生物蛋白(MCP)浓度。其中用于测定 VFA 和 NH<sub>3</sub>-N 浓度的样品中按比例加入 25%偏磷酸溶液(5:1, V/V), -20 ℃保存待测。

#### 1.5 测定指标及方法

发酵底物、TMR 的干物质、粗灰分、粗蛋白质含量,发酵 24 h 残渣的干物质含量的测定参照 AOAC (2000) [9]的方法。发酵底物、TMR 的淀粉含量采用酶法测定,淀粉葡萄糖苷酶及α-淀粉酶购自爱尔兰 Megazyme 公司。发酵底物、TMR 的中性洗涤纤维(NDF)和酸性洗涤纤维(ADF)含量参照 Van Soest 等[10]的方法,采用 Ankom 220 纤维分析仪(美国 ANKOM 公司)测定。

发酵液 pH 采用 Sartorius Basic pH Meter PB-20 酸度计测定。发酵液 NH<sub>3</sub>-N 浓度采用 Broderick 等[11]报道的靛酚比色法测定。发酵液 VFA 浓度采用日本岛津 GC-200 气相色谱仪测定,色谱条件如下:气化室参数,载气为氮气,载气温度 220 ℃,分流比 40:1;进样量为 0.4 μL;色谱柱参数,流量 2.0 mL/min,平均线速度为 38 cm/s;柱温箱参数,升温程序为 120 ℃ 3 min,以 10 ℃/min 的速度升温至 180 ℃,保持 1 min;检测器参数,氢气流量为 40 mL/min,空气流量为 450 mL/min,尾吹流量为 45 mL/min,火焰氢离子检测器(FID)温度为 250 ℃。

发酵液中 MCP 浓度的测定采用嘌呤碱基法测定[12]。利用酵母 RNA 为标准品制作标准曲线,10 mL 发酵液经前处理后利用 UV-2000 型紫外分光光度计在 260 nm 处比色,测定紫外吸光度。根据吸光度值及标准曲线计算样品 RNA 浓度。MCP 计算公式如下:

微生物蛋白氮浓度(mg/mL)=RNA 浓度(mg/mL)×RNA 含氮量(17.83%)/细菌氮中 RNA 含氮量(10%)×稀释倍数;

MCP 浓度(mg/mL)=微生物蛋白氮浓度(mg/mL)×6.25。

发酵液微生物相对定量:发酵液总 DNA 的提取采用珠磨-十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)

法<sup>[13]</sup>。DNA 经紫外分光光度计测定其浓度和纯度，确保 DNA 在 260 与 280 nm 处 OD 值的比值在 1.6~1.8，且利用琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 在加样孔附近出现整齐的亮带，将 DNA 样品-20 ℃保存备用。

利用实时荧光定量 PCR（RT-qPCR）技术检测微生物的相对数量，所用仪器为 ABI7500 型 PCR 仪，RT-qPCR 的反应条件及体系组成参照 SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> 试剂建立 20 μL 反应体系。反应程序为：95 ℃预变性 5 min，95 ℃变性 5 s，50~55 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 40 s，35 个循环；每个样品 3 个重复。引物序列见表 3，由上海生工生物工程有限公司合成。

目标细菌相对数量表示为该菌相对于瘤胃总细菌 16S rDNA 的百分比：

目标细菌相对数量（%）= $[2^{- (Ct_{\text{目标细菌}} - Ct_{\text{总细菌}})}] \times 100$ 。

式中： $Ct_{\text{目标细菌}}$  为目标细菌的循环阈值； $Ct_{\text{总细菌}}$  为总细菌的循环阈值。

表 3 引物序列

Table 3 Primer sequences		
项目 Items	引物序列 Sequence (5' → 3' )	参考文献 References
总菌	F: GAAGAGTTTGATCATGGCTCAG	Khafipour 等 <sup>[14]</sup>
Total bacterial	R: CTGCTGCCTCCCGTAG	
黄色瘤胃球菌	F: CGAACGGAGATAATTTGAGTTTACTTAGG	Cerrato-Sánchez 等 <sup>[15]</sup>
<i>R. flavefaciens</i>	R: CGGTCTCTGTATGTTATGAGGTATTACC	
白色瘤胃球菌	F: CCCTAAAAGCAGTCTTAGTTCG	Wang 等 <sup>[16]</sup>
<i>R. albus</i>	R: CCTCCTTGCGGTTAGAACA	
产琥珀酸丝状杆菌	F: GGCGGGATTGAATGTACCTTGAGA	Cerrato-Sánchez 等 <sup>[15]</sup>
<i>F. succinogenes</i>	R: TCCGCCTGCCCCGTAAGTATC	
溶纤维丁酸弧菌	F: ACCGCATAAGCGCACGGA	Stevemson 等 <sup>[17]</sup>
<i>B. fibrisolvens</i>	R: CGGGTCCATCTTGTACCGATAAAT	
牛链球菌	F: TTCCTAGAGATAGGAAGTTTCTTCGG	Stevemson 等 <sup>[17]</sup>
<i>S. bovis</i>	R: ATGATGGCAACTAACAAATAGGGGT	
嗜淀粉瘤胃杆菌	F: CTGGGGAGCTGCCTGAAT	Stevemson 等 <sup>[17]</sup>
<i>R. amylophilus</i>	R: CATCTGAATGCGACTGGTTG	
溶淀粉琥珀酸单胞菌	F: CGTTGGGCGGTCATTTGAAAC	Khafipour 等 <sup>[18]</sup>
<i>S. amylolytica</i>	R: CCTGAGCGTCAGTTACTATCCAGA	

1.6 产气量和产气参数的计算

计算 4、8、12、24、36 和 48 h 的产气量，采用以下动态发酵模型计算产气参数：

$GP=a+b (1-\exp^{-ct})$  <sup>[19]</sup>。

式中： $a$  为快速发酵部分产气量（mL）； $b$  为慢速发酵部分产气量（mL）； $c$  为产气速率（%/h）； $a+b$  为潜在产气量（mL）； $GP$  为  $t$  时间点的产气量（mL）。根据非线性最小二乘



131 法原理，求出  $a$ 、 $b$  和  $c$  的值。

132 1.7 数据处理与统计

133 数据采用 SAS 9.2 软件处理，用 Mixed 模型进行统计分析。 $P<0.05$  表示差异显著。

134 2 结果与分析

135 2.1 DCGF 与羊草组合替代苜蓿干草对体外发酵产气量和产气参数的影响

136 由表 4 可知，随着替代比例的增加，各时间点产气量均随之增加，但发酵 12 h 后 15DCGF  
137 组产气量显著低于 11DCGF 组 ( $P<0.05$ )，与 7DCGF 组差异不显著 ( $P>0.05$ )。11DCGF 组  
138 12 h 后产气量均显著高于其他各组 ( $P<0.05$ )。7DCGF 组与 15DCGF 组各时间点产气量差异  
139 不显著 ( $P>0.05$ )，且均高于 0DCGF 组 ( $P<0.05$ )。0DCGF 组与 3DCGF 组在发酵前 36 h 产  
140 气量差异不显著 ( $P>0.05$ )。

141 3DCGF 和 7DCGF 组的快速发酵部分产气量较低，显著低于 11DCGF 和 15DCGF 组  
142 ( $P<0.05$ )。11DCGF 组慢速发酵部分产气量和潜在产气量最大，显著高于其他各组 ( $P<0.05$ )。  
143 0DCGF 组的潜在产气量显著低于其他各组 ( $P<0.05$ )，产气速度显著低于 7DCGF、11DCGF、  
144 15DCGF 组 ( $P<0.05$ )。

145 表 4 DCGF 与羊草组合替代苜蓿干草对体外发酵产气量及产气参数的影响

146 Table 4 Effects of replacing alfalfa hay with DCGF and *Chinese leymus* on gas production and gas parameters of  
147 *in vitro* fermentation

项目	组别 Groups					SEM	P 值
Items	0DCGF	3DCGF	7DCGF	11DCGF	15DCGF		P-value
产气量 GP/（mL/g）							
4 h	18.1 <sup>c</sup>	20.2 <sup>bc</sup>	21.5 <sup>ab</sup>	23.9 <sup>a</sup>	21.9 <sup>ab</sup>	0.80	0.01
8 h	46.3 <sup>c</sup>	51.3 <sup>bc</sup>	52.5 <sup>b</sup>	58.7 <sup>a</sup>	53.6 <sup>ab</sup>	1.72	<0.01
12 h	57.2 <sup>c</sup>	61.42 <sup>bc</sup>	62.3 <sup>b</sup>	70.9 <sup>a</sup>	61.9 <sup>b</sup>	1.44	<0.01
24 h	88.5 <sup>c</sup>	93.43 <sup>bc</sup>	95.3 <sup>b</sup>	103.6 <sup>a</sup>	94.8 <sup>b</sup>	1.91	<0.01
36 h	109.3 <sup>c</sup>	112.22 <sup>c</sup>	125.8 <sup>b</sup>	139.3 <sup>a</sup>	126.8 <sup>b</sup>	2.18	<0.01
48 h	118.6 <sup>d</sup>	126.40 <sup>c</sup>	134.4 <sup>b</sup>	156.3 <sup>a</sup>	138.7 <sup>b</sup>	1.99	<0.01
产气参数 GP parameters							
快速发酵部分产气量 GP of rapidly degraded fraction/mL	1.23 <sup>ab</sup>	1.16 <sup>b</sup>	1.19 <sup>b</sup>	1.30 <sup>a</sup>	1.29 <sup>a</sup>	0.029	0.02
慢速发酵部分产气量 GP of slowly degraded fraction/mL	119.0 <sup>c</sup>	126.4 <sup>d</sup>	133.4 <sup>c</sup>	155.2 <sup>a</sup>	138.1 <sup>b</sup>	1.46	<0.01
潜在产气量 Potential GP/mL	120.2 <sup>c</sup>	127.6 <sup>d</sup>	134.6 <sup>c</sup>	156.5 <sup>a</sup>	139.4 <sup>b</sup>	1.49	<0.01
产气速率 GP rate/(%/h)	0.089 <sup>d</sup>	0.092 <sup>cd</sup>	0.095 <sup>bc</sup>	0.102 <sup>a</sup>	0.098 <sup>b</sup>	0.001	<0.01

148 同行数据肩标不同字母表示差异显著 ( $P<0.05$ )，相同或无字母表示差异不显著 ( $P>0.05$ )。下表同。

In the same row, values with different small letter superscripts mean significant difference ( $P<0.05$ ), while with the same or no letter superscripts mean no significant difference ( $P>0.05$ ). The same as below.

2.2 DCGF 与羊草组合替代苜蓿干草对体外发酵参数的影响

由表 5 可知,与 0DCGF 组相比,11DCGF 和 15DCGF 组干物质消失率显著提高( $P<0.05$ )。随着替代比例的增加,发酵液 pH 随之降低,7DCGF、11DCGF、15DCGF 组显著低于 0DCGF、3DCGF 组( $P<0.05$ ),11DCGF、15DCGF 组显著低于 7DCGF 组( $P<0.05$ )。11DCGF 和 15DCGF 组发酵液  $\text{NH}_3\text{-N}$  浓度较高,0DCGF 和 3DCGF 组较低,差异显著 ( $P<0.05$ )。苜蓿干草被部分替代后,发酵液 MCP 浓度有所提高,7DCGF 和 11DCGF 组显著高于 0DCGF 组( $P<0.05$ )。与 0DCGF 组相比,由苜蓿干草被部分替代后,发酵液总挥发性脂肪酸浓度显著提高( $P<0.05$ ),其中以 11DCGF 和 15DCGF 组较高。11DCGF、15DCGF 组发酵液乙酸、丙酸、丁酸浓度显著高于 0DCGF 组 ( $P<0.05$ )。发酵液乙酸/丙酸随着替代比例的增加而降低,0DCGF 组显著高于其他各组 ( $P<0.05$ )。

表 5 DCGF 与羊草组合替代苜蓿干草对体外发酵参数的影响

Table 5 Effects of replacing alfalfa hay with DCGF and *Chinese leymus* on *in vitro* fermentation parameters

项目 Items	组别 Groups					SEM	P 值 P-value
	0DCGF	3DCGF	7DCGF	11DCGF	15DCGF		
干物质消失率 DMD/%	45.9 <sup>c</sup>	46.9 <sup>c</sup>	48.8 <sup>b</sup>	52.4 <sup>a</sup>	51.4 <sup>a</sup>	0.59	<0.01
pH	6.73 <sup>a</sup>	6.69 <sup>a</sup>	6.60 <sup>b</sup>	6.56 <sup>c</sup>	6.55 <sup>c</sup>	0.02	<0.01
氨态氮 $\text{NH}_3\text{-N}$ /(mg/dL)	18.92 <sup>c</sup>	19.53 <sup>c</sup>	23.15 <sup>b</sup>	25.55 <sup>a</sup>	26.68 <sup>a</sup>	0.37	0.02
微生物蛋白 MCP/(mg/mL)	3.34 <sup>b</sup>	3.41 <sup>ab</sup>	3.58 <sup>a</sup>	3.65 <sup>a</sup>	3.50 <sup>ab</sup>	0.06	0.04
总挥发性脂肪酸 TVFA/(mmol/L)	45.74 <sup>c</sup>	48.43 <sup>b</sup>	49.17 <sup>b</sup>	52.45 <sup>a</sup>	53.43 <sup>a</sup>	0.61	<0.01
乙酸 Acetate/(mmol/L)	32.18 <sup>c</sup>	33.58 <sup>bc</sup>	33.87 <sup>bc</sup>	35.62 <sup>ab</sup>	36.37 <sup>a</sup>	0.67	0.02
丙酸 Propionate/(mmol/L)	10.28 <sup>c</sup>	11.37 <sup>bc</sup>	11.77 <sup>bc</sup>	12.57 <sup>b</sup>	13.00 <sup>ab</sup>	0.55	0.01
丁酸 Butyrate/(mmol/L)	3.28 <sup>c</sup>	3.46 <sup>bc</sup>	3.54 <sup>bc</sup>	4.25 <sup>a</sup>	4.06 <sup>ab</sup>	0.19	0.03
乙酸/丙酸 Acetate/propionate	3.14 <sup>a</sup>	2.95 <sup>b</sup>	2.88 <sup>b</sup>	2.83 <sup>b</sup>	2.80 <sup>b</sup>	0.06	0.03

2.3 DCGF 与羊草组合替代苜蓿干草对体外发酵发酵液微生物区系的影响

由表 6 可知,从纤维分解菌上来看:11DCGF、15DCGF 组发酵液黄色瘤胃球菌、产琥珀酸丝状杆菌相对数量显著高于 0DCGF、3DCGF 组 ( $P<0.05$ ),7DCGF、11DCGF、15DCGF 组发酵液溶纤维丁酸弧菌相对数量显著高于其他 2 组 ( $P<0.05$ ),11DCGF、15DCGF 组显著高于 7DCGF 组 ( $P<0.05$ )。各组发酵液白色瘤胃球菌相对数量差异不显著 ( $P>0.05$ )。从淀粉分解菌来看:发酵液牛链球菌、嗜淀粉瘤胃杆菌、溶淀粉琥珀酸单胞菌的相对数量在各组间差



169 异不显著 ( $P>0.05$ )。

170 表 6 DCGF 与羊草组合替代苜蓿干草对体外发酵液微生物区系的影响

171 Table 6 Effects of replacing alfalfa hay with DCGF and *Chinese leymus* on *in vitro* fermentation fluid microflora

项目 Items	组别 Groups					SEM	P 值 P-value
	0DCGF	3DCGF	7DCGF	11DCGF	15DCGF		
黄色瘤胃球菌 <i>R. flavefaciens</i> /×10 <sup>-2</sup> %	3.18 <sup>b</sup>	3.30 <sup>b</sup>	4.27 <sup>ab</sup>	4.89 <sup>a</sup>	5.02 <sup>a</sup>	0.21	0.21
白色瘤胃球菌 <i>R. albus</i> /×10 <sup>-2</sup> %	1.66	1.43	1.57	1.82	2.01	0.19	0.68
产琥珀酸丝状杆菌 <i>F. succinogenes</i> /×10 <sup>-2</sup> %	6.69 <sup>c</sup>	6.81 <sup>c</sup>	7.43 <sup>bc</sup>	8.38 <sup>ab</sup>	9.25 <sup>a</sup>	0.33	0.03
溶纤维丁酸弧菌 <i>B. fibrisolvens</i> /×10 <sup>-2</sup> %	1.82 <sup>c</sup>	1.69 <sup>c</sup>	2.90 <sup>b</sup>	4.01 <sup>a</sup>	3.87 <sup>a</sup>	0.3	0.01
牛链球菌 <i>S. bovis</i> /×10 <sup>-1</sup> %	5.21	4.93	5.46	6.02	6.57	0.42	0.33
嗜淀粉瘤胃杆菌 <i>R. amylophilus</i> /×10 <sup>-1</sup> %	4.93	5.35	5.19	5.73	6.01	0.38	0.52
溶淀粉琥珀酸单胞菌 <i>S. amylolytica</i> /%	2.01	1.94	2.04	2.11	2.07	0.29	0.75

172 3 讨 论

173 饲料经瘤胃微生物发酵后的产气量是衡量饲料可发酵程度的重要指标,发酵产气量与营  
174 养物质的消化率呈正相关<sup>[20]</sup>。饲料碳水化合物和粗蛋白质是发酵产气的主要来源,饲料中  
175 可发酵养分含量和瘤胃微生物活性与发酵产气量显著相关<sup>[21]</sup>。本试验中,11DCGF 组各时间  
176 点产气量和慢速发酵部分产气量均高于其他各组,说明 11DCGF 组饲料消化率最高,可发  
177 酵有机物含量最高。DCGF 含有较高含量的可降解粗蛋白质和可发酵纤维,其干物质在瘤胃  
178 中的可降解部分大于其他粗饲料<sup>[4]</sup>。Silva 等<sup>[22]</sup>研究认为不同粗饲料组合可能出现饲料间的  
179 正组合效应,即改善低质粗饲料的消化率,原因是当饲料中低质粗饲料和优质粗饲料组合时,  
180 降解纤维的优势菌群会首先附着于易消化的纤维上,并快速增殖生长,从而提高低质粗饲料  
181 的降解率,继而提高产气量及 NH<sub>3</sub>-N、VFA 等的浓度。因此,本试验中 DCGF 与羊草组合部  
182 分替代苜蓿干草后可能产生了正组合效应,一定程度上提高了不易消化羊草的降解率,所以  
183 7DCGF、11DCGF、15DCGF 组饲料的产气量相对于 0DCGF 和 3DCGF 组饲料均有所提高。  
184 0DCGF 组饲料中由于粗饲料组成比较单一,苜蓿干草的干物质可消化部分含量较高,ADF  
185 含量亦高于 DCGF, NDF 含量较低,所以 0DCGF 组饲料快速发酵部分产气量相对较高,而  
186 慢速发酵部分产气量及产气速度相对较低。

187 pH 则是反映瘤胃内环境的重要指标,是影响瘤胃微生物生长代谢的重要因素,偏离正  
188 常范围的 pH 会降低瘤胃微生物活性,不利于瘤胃微生物发酵饲料养分及其自身的生长和繁  
189 殖<sup>[23]</sup>。瘤胃中纤维分解菌的最佳活性 pH 范围为 6.2~6.8,如果 pH 低于 6.2,纤维分解菌的  
190 活性降低、繁殖受限,纤维类物质的降解率降低<sup>[24]</sup>。本试验中,随着替代比例的增加,发

酵 24 h 发酵液 pH 呈降低的趋势, 但均处在正常 pH 范围内, 说明发酵环境稳定, 有利于微生物的生长和代谢。VFA 的产生和积累导致瘤胃液 pH 下降, 随着替代比例的增加, 发酵液 VFA 浓度提高, 因此 pH 呈降低趋势。

$\text{NH}_3\text{-N}$  是含氮物质在瘤胃内分解的主要产物, 其浓度可以反映饲粮蛋白质在瘤胃中的降解情况及其被微生物利用的效率。瘤胃中适宜的  $\text{NH}_3\text{-N}$  浓度是提高 MCP 合成效率的必要条件, 浓度过高说明微生物利用氨的速度与生成氨的速度不协同, 可能造成蛋白质的浪费; 过低的  $\text{NH}_3\text{-N}$  浓度抑制微生物的生长, 降低 MCP 的合成效率<sup>[25]</sup>。Hoover<sup>[26]</sup>报道瘤胃中微生物生长的最适宜氨浓度为 3.3~8.0 mg/dL, 而大多数情况下瘤胃液  $\text{NH}_3\text{-N}$  浓度在较大的范围 (1~76 mg/dL) 内波动。本试验中, 随替代比例的增加, 发酵液中  $\text{NH}_3\text{-N}$  浓度升高, 说明饲粮粗蛋白质降解率有所提高, 为瘤胃微生物发酵提供了更多的底物。DCGF 的 CP 快速发酵部分含量显著高于苜蓿干草, CP 的瘤胃降解率高于苜蓿干草<sup>[27]</sup>。因此, 11DCGF 和 15DCGF 组饲粮的可降解粗蛋白质含量有所提高, 为瘤胃微生物提供了比较充足的氮源。反刍动物主要以 VFA 的形式利用能量, 碳水化合物在瘤胃中发酵产生大量的 VFA, 其中乙酸、丙酸和丁酸占总挥发性脂肪酸的 95% 以上<sup>[28]</sup>。Leng 等<sup>[29]</sup>认为瘤胃液 VFA 浓度和比例主要与饲粮非纤维性碳水化合物 (NFC) 和 NDF 含量有关; 饲粮中粗饲料品质也会影响瘤胃的发酵模式 and 功能<sup>[30]</sup>。本试验中, DCGF 与羊草组合替代饲粮中不同比例苜蓿干草经体外发酵后乙酸、丙酸和丁酸浓度有所提高, 这可能是因为粗饲料组合影响了瘤胃微生物区系及纤维降解酶活性。同时, DCGF 富含半纤维素<sup>[28]</sup>, 随着饲粮中 DCGF 比例的提高, 饲粮半纤维素含量升高, ADF 含量降低, 饲粮可降解纤维含量的增加提高了发酵液 VFA 浓度, 从而为瘤胃微生物生长繁殖提供充足的能量。此外, 较高含量的 NFC 可以提高饲粮的降解速率和降解率<sup>[31]</sup>。因此, 11DCGF 和 15DCGF 组饲粮干物质消失率较高。

张智慧等<sup>[32]</sup>研究发现, 不同粗饲料组合会影响瘤胃内溶纤维丁酸弧菌、产琥珀酸丝状杆菌及黄色瘤胃球菌等分解纤维的菌群的数量, 从而影响饲粮纤维的降解和 VFA 浓度。根据 Silva 等<sup>[22]</sup>的组合效应理论, 本试验中, 瘤胃微生物可能优先利用 DCGF 中较易消化的纤维, 并提高微生物活性, 进一步提高其他 ADF 含量较高的粗饲料如羊草的纤维降解率, 从而提高发酵液乙酸浓度。不同种类饲料间可以通过营养物质间的互补作用来弥补单一饲料营养物质不平衡的缺点, 为瘤胃微生物代谢提供更好的条件, 从而提高瘤胃发酵水平和 MCP

浓度,为奶牛生产提供更多的营养物质<sup>[33]</sup>。本试验中,DCGF与羊草组合部分替代苜蓿干草后整体发酵水平提高,发酵液 $\text{NH}_3\text{-N}$ 和VFA浓度增加,微生物的生长代谢加快,MCP浓度有所增加,这可能与DCGF、羊草、苜蓿干草及玉米青贮间正组合效应有关,体外发酵产气参数也表明这种正组合效应可能存在。

瘤胃中的纤维分解菌主要有黄色瘤胃球菌、白色瘤胃球菌、产琥珀酸丝状杆菌和溶纤维丁酸弧菌,本试验结果表明体外发酵24 h发酵液黄色瘤胃球菌、产琥珀酸丝状杆菌和溶纤维丁酸弧菌相对数量随替代比例增加而提高。Silva等<sup>[22]</sup>研究认为,相比于难消化纤维如秸秆,瘤胃细菌在易消化的纤维饲料表面附着能力更强,有利于细菌更好地作用于食糜团,从而提高微生物繁殖效率和饲料的利用效率。溶纤维丁酸弧菌既能够降解纤维,也是最主要的蛋白质分解菌,DCGF中高含量的可溶性蛋白质为其生长提供了充足的氮素。

#### 4 结 论

①DCGF与羊草组合替代奶牛饲料中部分苜蓿干草提高了体外发酵48 h的产气量、潜在产气量和产气速率,提高了体外发酵24 h发酵液MCP、 $\text{NH}_3\text{-N}$ 、乙酸、丙酸、丁酸和TVFA浓度,并提高了体外发酵24 h发酵液主要纤维分解菌的相对数量。

②DCGF与羊草组合替代饲料中17.50%和22.90%苜蓿干草较为适宜,此时饲料中DCGF的比例分别为11.00%和15.00%,但DCGF属于短纤维饲料,缺乏物理有效纤维,因此还需要进一步在体内试验中验证。

#### 参考文献:

[1] 韩成伟,安载学,王玮,等.1992–2016年我国苜蓿进出口变化及成因分析[J].农业网络信息,2016(12):16–20.

[2] HAO X Y,GAO H,WANG X Y,et al.Replacing alfalfa hay with dry corn gluten feed and Chinese wild rye grass:effects on rumen fermentation,rumen microbial protein synthesis,and lactation performance in lactating dairy cows[J].Journal of Dairy Science,2017,100(4):2672–2681.

[3] SARWAR M,FIRKINS J L,EASTRIDGE M L.Effect of replacing neutral detergent fiber of forage with soyhulls and corn gluten feed for dairy heifers[J].Journal of Dairy Science,1991,74(3):1006–1017.

- [4] KELZER J M, KONONOFF P J, TEDESCHI L O, et al. Evaluation of protein fractionation and ruminal and intestinal digestibility of corn milling co-products[J]. Journal of Dairy Science, 2010, 93(6): 2803–2815.
- [5] MACLEOD G K. Wet corn gluten feed for dairy cows[J]. Highlights of Agricultural Research in Ontario, 1984, 7(1): 12–14.
- [6] MONTGOMERY S P, DROUILLARD J S, SINDT J J, et al. Combinations of alfalfa hay and wet corn gluten feed in limit-fed growing diets for beef cattle[J]. Journal of Animal Science, 2003, 81(7): 1671–1682.
- [7] FIRKINS J L, EASTRIDGE M L, PALMQUIST D L. Replacement of corn silage with corn gluten feed and sodium bicarbonate for lactating dairy cows[J]. Journal of Dairy Science, 1991, 74(6): 1944–1952.
- [8] 中华人民共和国农业部. NY/T34–2004 奶牛饲养标准[S]. 北京: 中国农业出版社, 2004.
- [9] AOAC International. Official methods of analysis[M]. 17th ed. Gaithersburg: AOAC International, 2000.
- [10] VAN SOEST P J, ROBERTSON J B, LEWIS B A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition[J]. Journal of Dairy Science, 1991, 74(10): 3583–3597.
- [11] BRODERICK G A, KANG J H. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and *in vitro* media[J]. Journal of Dairy Science, 1980, 63(1): 64–75.
- [12] MAKKAR H P S, BECKER K. Purine quantification in digesta from ruminants by spectrophotometric and HPLC methods[J]. British Journal of Nutrition, 1999, 81(2): 107–112.
- [13] 刘凯玉. 不同方法处理稻秸对瘤胃降解及其体外甲烷产生量的影响[D]. 硕士学位论文. 哈尔滨: 东北农业大学, 2014.
- [14] KHAFIPOUR E, KRAUSE D O, PLAIZIER J C. A grain-based subacute ruminal acidosis challenge causes translocation of lipopolysaccharide and triggers inflammation[J]. Journal of Dairy Science, 2009, 92(3): 1060–1070.

- [15] CERRATO-SÁNCHEZ M, CALSAMIGLIA S, FERRET A. Effect of the magnitude of the decrease of rumen pH on rumen fermentation in a dual-flow continuous culture system[J]. *Journal of Animal Science*, 2008, 86(2): 378–383.
- [16] WANG R F, CAO W W, CERNIGLIA C E. PCR detection of *Ruminococcus* spp. in human and animal faecal samples[J]. *Molecular and Cellular Probes*, 1997, 11(4): 259–265.
- [17] STEVENSON D M, WEIMER P J. Dominance of *Prevotella* and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real-time PCR[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 75(5): 165–174.
- [18] KHAFIPOUR E, LI S C, PLAIZIER J C, et al. Rumen microbiome composition determined using two nutritional models of subacute ruminal acidosis[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(22): 7115–7124.
- [19] ØRSKOV E R, MCDONALD I. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage[J]. *Journal of Agricultural Science*, 1979, 92(2): 499–503.
- [20] MENKE K H, RAAB L, SALEWSKI A, et al. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*[J]. *Journal of Agricultural Science*, 1979, 93(1): 217–222.
- [21] 雷冬至, 金曙光, 乌仁塔娜. 用体外产气法评价不同粗饲料与相同精料间的组合效应[J]. *饲料工业*, 2009, 30(3): 30–33.
- [22] SILVA A T, GREENHALGH J F D, ØRSKOV E R. Influence of ammonia treatment and supplementation on the intake, digestibility and weight gain of sheep and cattle on barley straw diets[J]. *Animal Production*, 1989, 48(1): 99–108.
- [23] RUSSELL J B. The importance of pH in the regulation of ruminal acetate to propionate ratio and methane production *in vitro*[J]. *Journal of Dairy Science*, 1998, 81(12): 3222–3230.
- [24] 卢德勋. 系统动物营养学导论[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2004.
- [25] 张吉鹏, 李龙瑞, 吴文旋, 等. 稻草补饲苜蓿对山羊瘤胃发酵的组合效应[J]. *草业科*

学,2014,31(2):313–320.

[26] HOOVER W H. Chemical factors involved in ruminal fiber digestion[J]. Journal of Dairy Science, 1986, 69(10): 2755–2766.

[27] 郝小燕, 高红, 张幸怡, 等. 应用康奈尔净碳水化合物-蛋白质体系和 NRC 模型比较常用粗饲料和玉米纤维饲料的营养价值[J]. 动物营养学报, 2016, 28(3): 842–850.

[28] 李炯明, 庄苏, 王恬, 等. 海南霉素对人工瘤胃体外发酵调控的影响[J]. 家畜生态学报, 2007, 28(1): 41–46.

[29] LENG R A, BRETT D J. Simultaneous measurements of the rates of production of acetic, propionic and butyric acids in the rumen of sheep on different diets and the correlation between production rates and concentrations of these acids in the rumen[J]. British Journal of Nutrition, 1966, 20(3): 541–552.

[30] 刘大程, 卢德勋, 侯先志, 等. 不同品质粗饲料日粮对瘤胃发酵及主要纤维分解菌的影响[J]. 中国农业科学, 2008, 41(4): 1199–1206.

[31] ZHU W, FU Y, WANG B, et al. Effects of dietary forage sources on rumen microbial protein synthesis and milk performance in early lactating dairy cows[J]. Journal of Dairy Science, 2013, 96(3): 1727–1734.

[32] 张智慧, 杨红建, 任清长, 等. 不同粗饲料组合全混合日粮对泌乳奶牛瘤胃液微生物蛋白浓度 24h 变化和小肠微生物蛋白流量的影响[J]. 动物营养学报, 2013, 25(9): 2005–2011.

[33] 谭支良, 卢德勋. 提高粗饲料利用效率的系统组合营养技术及其组合效应的研究进展[J]. 饲料博览, 1999(7): 6–10.

Effects of Replacing Alfalfa Hay with Dry Corn Gluten Feed and *Chinese leymus* on *in Vitro* Rumen Fermentation<sup>2</sup>

HAO Xiaoyan<sup>1,2</sup> ZHANG Guangning<sup>1</sup> YAO Enyue<sup>1</sup> LIU Yan<sup>1</sup> SUN Kaijing<sup>1</sup> ZHANG Yonggen<sup>1\*</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin

150030, China; 2. College of Animal Science and Technology, Shanxi Agricultural University,

\*Corresponding author, professor, E-mail: [zhangyonggen@sina.com](mailto:zhangyonggen@sina.com)

(责任编辑 王智航)



Taigu 030801, China)

**Abstract:** The aim of this study was to investigate the effects of replacing alfalfa hay with dry corn gluten feed (DCGF) and *Chinese leymus* on *in vitro* rumen fermentation of dairy cows. A diet for dairy cows was used as a fermentation substrate. Different proportions (0, 5.00%, 10.50%, 17.50% and 22.90%) of alfalfa hay in the substrate were replaced with combinations of DCGF and *Chinese leymus* (DCGF proportion in the fermentation substrate was 0, 3.00%, 7.00%, 11.00% and 15.00%, respectively), which were named 0DCGF, 3DCGF, 7DCGF, 11DCGF, 15DCGF groups, respectively. Fermentation parameters and microflora after fermented for 24 h, and gas production parameters after fermented for 48 h were determined. The results showed as follows: 1) replacing alfalfa hay with DCGF and *Chinese leymus* had significant effects on gas production (GP), potential gas production and gas production rate of *in vitro* fermentation ( $P<0.05$ ), which showed firstly increased and then decreased tendency with the increase of replacing proportion, and 11DCGF group had the highest values; replacing alfalfa hay with DCGF and *Chinese leymus* had significant effects on dry matter disappearance rate of *in vitro* fermentation ( $P<0.05$ ), 11DCGF and 15DCGF groups were significantly higher than the other groups ( $P<0.05$ ). 2) Replacing alfalfa hay with DCGF and *Chinese leymus* had significant effects on the concentrations of microbial protein (MCP), ammonia nitrogen, acetic acid, propionic acid, butyric acid and total volatile fatty acids (TVFA) in fermentation fluid ( $P<0.05$ ), which showed firstly increased and then gentle tendency; replacing alfalfa hay with DCGF and *Chinese leymus* had significant effects on pH in fermentation fluid ( $P<0.05$ ), which showed firstly decreased and then gentle tendency. 3) Replacing alfalfa hay with DCGF and *Chinese leymus* had significant effects on the relative counts of *R. flavefaciens*, *F. succinogenes* and *B. fibrisolvans* in fermentation fluid ( $P<0.05$ ), which showed firstly increased and then gentle tendency; there were no significant difference of the relative counts of *S. bovis*, *S. amylolytica*, *R. amylophilus*, *R. albus* in fermentation fluid among groups ( $P>0.05$ ). It is concluded that replacing alfalfa hay in diet for dairy cows with DCGF and *Chinese leymus* can improve *in vitro* rumen fermentation, when the replacing proportions are 17% and 23%, the effects are better, and the proportions of DCGF are 11.00% and

352 15.00% at this time, respectively.

353 **Key words:** dry corn gluten feed; alfalfa hay; gas production; rumen fermentation; microflora